

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ IgG ПРИ ВИРУСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

*Генералов И.И., Железняк Н.В., Дмитриченко Т.И., Стычневская Е.В.,
Жерулик С.В., Генералова А.Г., Зыкова О.С.
УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов
медицинский университет»*

Введение. Активность каталитических антител (или абзимов) является объектом интенсивного изучения в течение последних 15-20 лет. Однако, учитывая сравнительно короткий срок исследования поликлональных каталитических иммуноглобулинов (ИГ), а также широкий спектр возможных видов абзимной активности, многие важные особенности их действия остаются пока неизученными. Весьма вероятно появление каталитических антител (АТ) не только при аутоиммунизации, но и при развитии инфекционных процессов. И в том и другом случае происходит многократная стимуляция системы иммунитета с возможностью генерации каталитических АТ.

Необходимо отметить, что каталитическая активность АТ при инфекциях вирусной этиологии практически не изучена. Нашими предварительными

исследованиями удалось показать, что при развитии вирусных инфекций действительно возникают АТ, обладающие каталитической активностью (Невинский Г.А., Генералов И.И. 2000-2002 [1, 2]. При этом появляющиеся аутоабзимы проявляют самую разную субстратную специфичность, в первую очередь – протеолитическую и нуклеазную.

Целью настоящей работы стало определение абзимной протеолитической активности ИГ больных гепатитами В и С, герпетической инфекцией и здоровых лиц и сравнение активности абзимов-протеаз в зависимости от их субстратной специфичности.

Материалы и методы. Протеолитическая активность иммуноглобулинов класса G оценивалась у 24 практически здоровых лиц (контрольная группа доноров крови), 19 больных инфекционным мононуклеозом (герпетической инфекцией, вызванной вирусом герпеса 4 типа), 7 больных инфекцией *herpes labialis* (вирусом герпеса 1 типа), 7 больных ветряной оспой и 4 больных опоясывающим лишаем (герпетической инфекцией, вызванной вирусом герпеса 3 типа), 18 больных вирусными гепатитами В и С.

Диагноз заболеваний устанавливался на базе Витебской областной инфекционной больницы, Витебского областного клинического кожно-венерологического диспансера, забор сыворотки крови доноров проводился на Витебской областной станции переливания крови.

Для определения протеолитической активности ИГ использовали синтетические субстраты, включающие нитроанилиды различных аминокислот и пептидов: бензоил-DL-аргинин- α -нитроанилид (АНА), бензоил-тирозин- α -нитроанилид (ТНА), лизин- α -нитроанилид (ЛНА), валил-глицин-аргинин- α -нитроанилид (ВГАНА). Все реакции выполняли по сходной схеме. К 0,2 мл субстрата (растворится в минимальном объеме диметилсульфоксида) в концентрации 0,5 мг/мл на 0,05М трис-HCl буфере pH 8,3, содержащем 0,025% азида натрия, добавляли 0,05 мл препарата IgG в концентрации 1 мг/мл. Инкубировали в течение 20 ч при температуре 37°C. Реакция ставилась в планшетах для иммуноферментного анализа (ИФА). Опытные и контрольные пробы дублировали. Регистрацию результатов проводили на фотометре Ф300 производства РУП «Витязь» (Витебск), методика №20, двухволновое измерение на 405 и 570 нм. Полученные данные выражали в условных единицах (УЕ), эквивалентных приросту оптической плотности опытной пробы в сравнении с холостой пробой.

С учетом возможности повышения абзимной активности в присутствии катионов металлов в дальнейших экспериментах в реакционный буфер добавляли хлорид цинка и сульфат меди в концентрации 0,00001М и хлориды магния и кальция в концентрации 0,001М.

Для сравнения данных между группами использовали метод множественных сравнений по Бонферрони и метод Краскелла-Уоллиса для множественного сравнения медиан. При сравнении двух выборок использовали критерии Стьюдента и Вилкоксона-Манна-Уитни. Корреляцию между признаками определяли по Спирмену.

Результаты и обсуждение. При оценке протеолитической активности абзимов с различными субстратами были получены следующие результаты.

Активность IgG доноров (Mcp+m) в отношении субстрата АНА составила $0,011 \pm 0,001$ УЕ (n=24); больных инфекционным мононуклеозом – $0,019 \pm 0,006$ УЕ

($n=18$), больных ветряной оспой – 0.036 ± 0.012 УЕ ($n=7$). Больных инфекцией *herpes labialis* – 0.029 ± 0.003 УЕ ($n=7$). При этом активность больных ветряной оспой и *herpes labialis* достоверно превышала активность IgG доноров и больных вирусными гепатитами В и С (0.017 ± 0.001 УЕ, $n=18$, $p < 0.001$). Аналогичные результаты были получены и при инфекции *herpes zoster* (0.025 ± 0.025 УЕ), однако эта выборка требует увеличения количества наблюдений.

Активность IgG доноров в отношении субстрата ВГАНА составила 0.024 ± 0.004 УЕ ($n=24$); больных инфекционным мононуклеозом – 0.020 ± 0.008 УЕ ($n=8$), больных ветряной оспой – 0.023 ± 0.007 УЕ ($n=7$), больных инфекцией *herpes zoster* – 0.0325 ± 0.012 УЕ ($n=4$), *herpes labialis* – 0.028 ± 0.015 УЕ ($n=7$), больных вирусными гепатитами В и С – 0.020 ± 0.004 УЕ, $n=18$. В этом случае достоверных различий между группами не установлено.

Что касается абзимного гидролиза субстрата ТНА, то отчетливой ТНА-гидролизующей активности во всех изученных группах обнаружено не было.

Наиболее интересные результаты были получены в отношении субстрата ЛНА. Кроме одного случая во всех изученных группах гидролизующей активности IgG в отношении лизин-нитроанилида выявлено не было. Исключение составила группа больных инфекционным мононуклеозом, где выраженная активность была обнаружена у 11 человек из 19, при этом ее средний уровень (0.095 ± 0.027 УЕ) оказался максимальным среди всех вариантов протеолитической активности.

Для этой группы абзимная активность в присутствии катионов металлов и без них оказалась сопоставимой. Тем не менее, были обнаружены отдельные пробы IgG, которые без катионов металлов не проявляли абзимного действия, однако впоследствии активировались при их добавлении. Исследования по изучению активирующей функции катионов металлов в отношении протеолитических абзимов в настоящее время продолжаются.

При проведении непараметрического корреляционного анализа обнаружены следующие зависимости: в группе доноров АНА-протеолитическая активность IgG прямо коррелировала с ВГАНА-протеолитической активностью ($r=-0.60$; $p=0.004$).

Аналогичная зависимость средней силы установлена при инфекционном мононуклеозе. Для сравнения в данной группе корреляции между АНА-гидролитической активностью и ЛНА-активностью обнаружено не было, что указывает на их различное происхождение.

Выводы.

1 Абзимная протеолитическая активность наиболее выражена в отношении субстратов, содержащих основные аминокислоты (лизин, аргинин).

2 При герпетической инфекции гидролитическая активность IgG в отношении лизин-нитроанилида обнаружена только при инфекционном мононуклеозе, что может служить дополнительным лабораторным критерием данной инфекции.

Литература.

1 Барановский А.Г., Матюшин В.Г., Власов А.В. и др. ДНК и РНК-гидролизующие антитела из крови больных различными формами вирусного гепатита // Биохимия. – 1997. – т.62, №12. – С.1590–1599.

2 Жильцов И.В., Генералов И.И., Доценко М.Л., Матвеев А.А. Ферментативная активность препаратов IgG при вирусных гепатитах // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 1998. – №4. – С 73–77.